

© БЕКИШ ВЛ.Я., ДУРНЕВ А.Д., 2004

ГЕНОТОКСИЧЕСКОЕ И ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ МЕТАБОЛИТОВ ЛИЧИНОК ТОКСОКАР НА СОМАТИЧЕСКИЕ И ГЕНЕРАТИВНЫЕ КЛЕТКИ ХОЗЯИНА*

БЕКИШ ВЛ.Я.*, ДУРНЕВ А.Д.**

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»,
кафедра медицинской биологии и общей генетики*,
НИИ фармакологии РАМН, лаборатория фармакологии мутагенеза, Москва**

*- Исследования выполнены по договору № Б04-125 с Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований.

Резюме. Изучены генотоксическое и цитотоксическое воздействия метаболитов личинок токсокар на клетки костного мозга и семенников инвазированных мышей линии СВА при применении щелочного гель-электрофореза единичных клеток. Установлено, что метаболиты личинок *Toxocara canis* во время инвазии вызывают рост одноцепочечных разрывов, щелочно-лабильных сайтов ядерной молекулы ДНК, апоптотических клеток в костном мозге и семенниках экспериментальных животных. Генотоксическое воздействие наблюдается в периоды высокой биологической активности паразитов (первичной и повторной миграции личинок в тканях хозяина), а цитотоксическое – на 14 день инвазии. Генотоксическое влияние метаболитов личинок токсокар на соматические и генеративные клетки хозяина усиливается при росте интенсивности инвазии.

Ключевые слова: токсокара, щелочной гель-электрофорез единичных клеток, клетки костного мозга и семенников, генотоксичность, цитотоксичность.

Abstract. The genotoxic and cytotoxic influences of toxocara larvae metabolites on bone marrow and testicles of invasive mice of cba line were investigated with alkaline single cell gel electrophoresis use. It was established, that toxocara canis metabolites caused increase of single-strand breaks, alkali-labile sites of nucleus molecule of DNA, apoptotic cells in bone marrow and testicles of experimental animals. The genotoxic influence was observed in periods of high biological activity of parasites (primary and secondary migrations of larvae in host tissues). The cytotoxic influence was observed on the 14th day of invasion. The genotoxic influence of toxocara larvae metabolites on somatic and generative cells of the host is increased when the invasion intensity grows.

Нами было показано, что белковый соматический продукт из половозрелых токсокар вызывает в лимфоцитах крови доноров рост одноцепочечных разрывов, щелочно-лабильных сайтов ядерной молекулы ДНК и числа апоптотических клеток при их совместном культивировании *in vitro* [3].

Личинки токсокар во время инвазии способны вызывать рост числа соматических клеток с микроядрами, индуцировать увеличение

уровней микроядродержащих сперматогониев, сперматоцитов и сперматид в семенниках экспериментальных животных, а также способствовать снижению активности сперматогенеза [1, 7, 8]. Цитогенетические изменения в соматических и генеративных клетках хозяина при экспериментальном висцеральном токсокарозе зависят от дозы введенного инвазионного материала при заражении и приходятся на периоды первичной и повторной миграций паразитов в тканях мышей [9]. В связи с этим была поставлена цель изучить возможные генотоксический и цитотоксический эффекты ме-

Адрес для корреспонденции: 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный медицинский университет, кафедра медицинской биологии и общей генетики - Бекиш Вл.Я.

таболитов личинок *Toxosara canis* на клетки костного мозга и семенников инвазированных животных.

Методы

Исследование проведено на 140 мышам-самцах линии СВА массой 16-18 г, разделенных на четыре группы по 35 животных в каждой. Мышам 1-ой группы (негативный контроль) вводили *per os* 0,2 мл 2% крахмального геля, животных 2-ой – заражали инвазионными яйцами *T. canis* внутрижелудочно в дозе 5, 3-ей – 20 и 4-ой группы 40 яиц/г массы тела [5]. Забой контрольных и зараженных животных (по 5 на срок наблюдения) проводили путем декапитации на 3, 7, 14, 21, 28, 60 и 90-й дни от начала инвазии. У мышей выделяли бедренные кости, семенники и получали из них клеточные суспензии костного мозга и клеток сперматогенеза для щелочного гель-электрофореза единичных клеток по предложенной нами методике [4]. Метод ДНК-комет проводили по N.P. Singh et al. [14] в модификации B. Hellman et al. [12]. Использовались камера с силовой установкой для электрофореза и все химические реактивы фирмы Sigma. Микропрепараты окрашивали раствором этидия бромид и анализировали на люминисцентном микроскопе Микмед-2 фирмы ЛОМО при увеличении 600х. Изображения «комет» на микропрепаратах фотографировали цифровой фотокамерой Nikon Coolpix-4500.

Учет повреждений молекулы ДНК проводили путем анализа цифровых изображений с помощью автоматической программы «CASP v. 1.2.2» [13]. В микропрепарате подсчитывалось по 100 клеток, в каждой из которых учитывали «длину хвоста» кометы в пикселях, процент ДНК в «хвосте» и как показатель генотоксического воздействия факторов среды – «момент хвоста», вычисленный из «длины хвоста», умноженной на процент ДНК в «хвосте». Для оценки цитотоксического воздействия метаболитов личинок токсокар в 100 случайно выбранных клетках определяли процент апоптотических. Результаты обрабатывались статистически с использованием программы Excel 2002. Рассчитывалась средняя арифметическая и ее стандартное отклонение ($M \pm SD$). Достоверность выявленных различий определяли по t-критерию Стьюдента.

Результаты

При проведении метода ДНК-комет в клетках костного мозга контрольных животных во время опыта «момент хвоста» варьировал от $0,10 \pm 0,03$ до $0,21 \pm 0,09$, а процент апоптотических клеток – от $1,60 \pm 0,55$ до $3,40 \pm 0,65$.

У зараженных в дозе 5 яиц/г мышей 2-ой группы только на 14-й день инвазии «момент хвоста» клеток костного мозга был выше в 4,6 раза, чем у животных негативного контроля (Рис. 1). В остальные сроки наблюдения иссле-

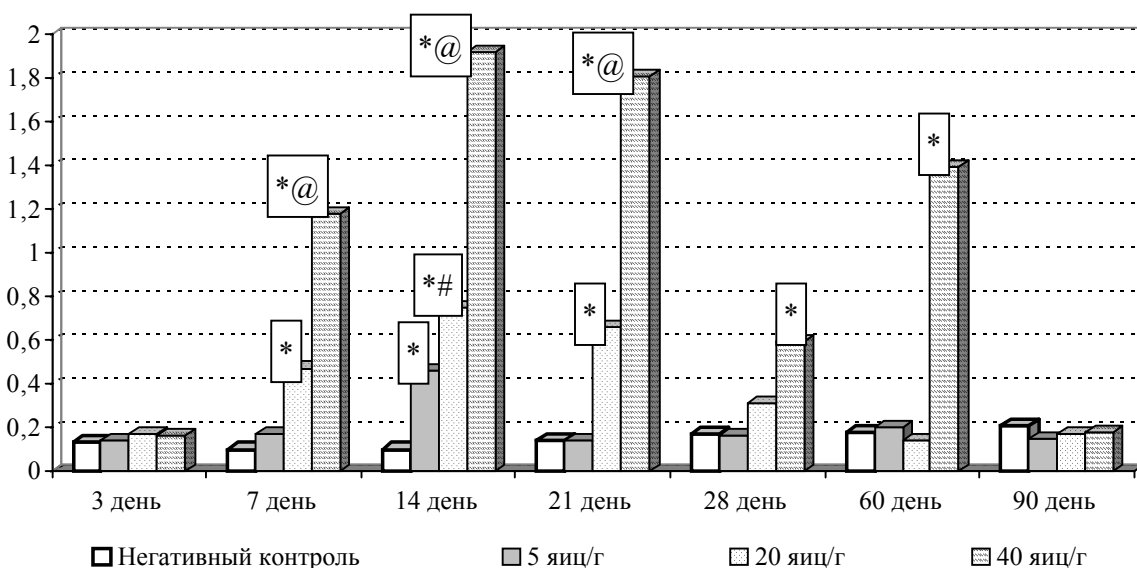


Рис. 1. «Момент хвоста» клеток костного мозга мышей-самцов линии СВА при висцеральном токсокарозе (* - достоверное отличие от негативного контроля, # - от данных дозы 5 яиц/г, @ - от данных дозы 20 яиц/г при $P < 0,01-0,05$).

дуемые показатели инвазированных животных не отличались от данных незараженных животных.

При увеличении дозы заражения до 20 яиц/г «момент хвоста» клеток костного мозга инвазированных токсокарами животных на 7-й день наблюдения в 4,7 раза превышал уровень контроля. К 14-му дню опыта «момент хвоста» был выше в 7,5 и 1,6 раза соответственно показателем негативного контроля и данным инвазированных животных 2-ой группы. Процент апоптотических клеток в 1,5 раза превышал уровень негативного контроля. На 21-й день наблюдения «момент хвоста» был выше в 4,7 раза показателей интактного контроля, а процент апоптотических клеток достоверно не отличался от контрольного уровня. На 28, 60 и 90-й дни опыта исследуемые показатели у зараженных животных не отличались от данных негативного контроля.

У зараженных в дозе 40 яиц/г массы тела мышей «момент хвоста» клеток костного мозга к 7-му дню инвазии был выше в 4,7 раза по сравнению с негативным контролем и в 2,5 раза превышал этот показатель при дозе 20 яиц/г. На 14-й день наблюдения «момент хвоста» был выше в 7,5 раза по сравнению с интактным контролем и в 2,56 раза – с этим показателем 3-ей

группы. Процент апоптотических клеток в 1,8 раза превышал уровень негативного контроля. К 21-му дню опыта «момент хвоста» был больше в 12,9 и 2,7 раза соответственно по сравнению с данными негативного контроля и животных, зараженных в дозе 20 яиц/г. «Момент хвоста» на 28-й и 60-й дни наблюдения был больше в 3,5 и 7,7 раза соответственно по сравнению с незараженными мышами, а процент апоптотических клеток достоверно не превышал уровень негативного контроля. На 90-й день опыта исследуемые показатели у зараженных животных не отличались от данных негативного контроля.

«Момент хвоста» клеток семенников интактных животных на протяжении опыта варьировал от $0,43 \pm 0,10$ до $0,58 \pm 0,13$, а процент апоптотических клеток – от $6,60 \pm 0,55$ до $7,40 \pm 0,55$.

У мышей, зараженных в дозе 5 яиц/г массы тела в клетках семенников, все исследуемые показатели не отличались от данных негативного контроля на протяжении всех сроков наблюдения (Рис. 2).

В клетках семенников мышей 3-ей группы (доза заражения 20 яиц/г) на 14-й день опыта наблюдалось повышение «момента хвоста» и процента апоптотических клеток в 1,9 и 1,6

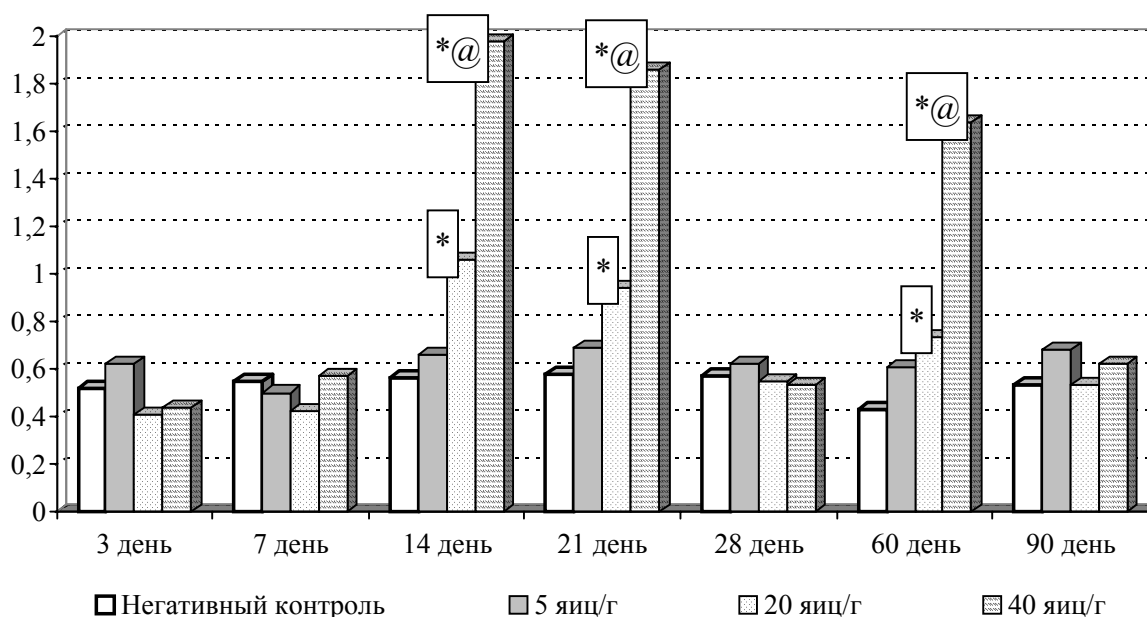


Рис. 2. «Момент хвоста» клеток семенников мышей-самцов линии СВА при висцеральном токсокарозе (* - достоверное отличие от негативного контроля, @ - от данных дозы 20 яиц/г при $P < 0,01-0,05$).

раза соответственно по сравнению с негативным контролем. К 21-му дню «момент хвоста» клеток семенников зараженных животных был выше в 1,6 раза, чем у интактных мышей. На 60-й день в клетках инвазированных животных «момент хвоста» был выше в 1,7 раза, чем в негативном контроле, а процент апоптотических клеток достоверно не отличался от контрольного уровня. На 28-й и 90-й дни опыта исследуемые показатели у зараженных животных не отличались от данных контроля.

У мышей 4-ой группы (доза заражения 40 яиц/г) на 14-й день опыта наблюдалось повышение «момента хвоста» в 3,5 раза по сравнению с интактным контролем и в 1,9 раза – с аналогичным показателем при дозе 20 яиц/г. Процент апоптотических клеток был выше в 1,4 раза по отношению к негативному контролю. К 21-му дню у животных, зараженных в дозе 40 яиц/г, «момент хвоста» был выше в 3,2 раза по отношению к данным интактных мышей и превышал в 2 раза показатель дозы 20 яиц/г. К 60-му дню «момент хвоста» клеток семенников у животных 4-ой группы был выше в 3,8 раза величин негативного контроля и в 2,2 раза превышал аналогичный показатель мышей 3-ей группы. Процент апоптотических клеток достоверно не отличался от контрольного уровня. На 28-й и 90-й дни опыта исследуемые показатели у зараженных животных не отличались от данных негативного контроля.

Обсуждение

Установлено, что метаболиты личинок токсокар обладают генотоксическим воздействием как на соматические, так и на генеративные клетки инвазированного хозяина, вызывая увеличение количества одноцепочечных разрывов и щелочно-лабильных сайтов ядерной ДНК в клетках костного мозга и семенников *in vivo*. Этот эффект зависит от особенностей биологии паразита и наиболее выражен в период активной миграции личинок токсокар по тканям хозяина с 7 по 21 день инвазии. На 28-й день опыта отмечалось отсутствие повреждений ДНК клеток костного мозга мышей при дозах заражения 5, 20 яиц/г и семенников при дозах заражения 5, 20, 40 яиц/г. Данные изменения, по-видимому, были связаны с остано-

вой миграции личинок токсокар по тканям хозяина. К 60-му дню опыта при дозе заражения 40 яиц/г отмечалось возобновление миграции паразитов, которая характеризовалась синхронным возрастанием уровней повреждений ядерной ДНК клеток костного мозга и семенников у инвазированных животных. Генотоксическое влияние токсокарозной инвазии на клетки хозяина зависит от дозы введенного инвазионного материала при заражении икратно достоверно возрастает при ее увеличении. Дозозависимое воздействие четко прослеживалось на росте «момента хвоста» клеток костного мозга в 1,6 - 2,7 раза при увеличении дозы заражения с 5 до 20 и до 40 яиц/г на 14 день наблюдения и с 20 до 40 яиц/г на 7 и 21 дни опыта. Этот эффект наблюдался также в семенниках инвазированных мышей при увеличении дозы заражения с 20 до 40 яиц/г на 14, 21 и 60-й дни опыта.

Личинки токсокар во время инвазии оказывают цитотоксическим воздействием, которое характеризовалось ростом процента апоптотических клеток костного мозга и семенников инвазированных животных при высоких дозах заражения (20 и 40 яиц/г) на 14 день инвазии. Этот эффект не зависел от дозы заражения.

Генотоксические и цитотоксические повреждения клеток костного мозга и семенников мышей, инвазированных личинками токсокар, можно связать с развитием окислительного стресса в организме хозяина при гельминтозах, а также со способностью метаболитов паразитов непосредственно повреждать ядерный аппарат клеток хозяина и стимулировать в них апоптоз [2]. Нами было показано, что при экспериментальном висцеральном токсокарозе на 30-й день инвазии в семенниках мышей отмечается повышение уровней продуктов перекисного окисления липидов (малоновый диальдегид, диеновые конъюгаты) и снижение активности ферментов – антиоксидантов (супероксиддисмутаза, каталаза) [6]. Известно, что при висцеральном токсокарозе в гомогенатах мышц мышей-самцов линии BALB/C повышается активность индуцибельной NO - синтазы с 21-го по 70-й дни инвазии [10]. При изучении воздействия соматического и экскреторно-секреторного антигенов *T. canis*, полученных из половозрелых паразитов и личинок второй ста-

дии, на синтез NO и простагландинов E₂ альвеолярными макрофагами крыс было установлено, что оба антигена дозозависимо усиливают высвобождение нитритов и простагландинов E₂ альвеолярными макрофагами [11]. Антиген из тканей *T. canis* проявляет митогенную активность в клетках селезенки мышей и В-лимфоцитах периферической крови человека в концентрациях от 1 до 125 мкг белка на 1 мл культурального содержимого, чем может нарушать нормальный ход митоза и способствовать росту повреждений в наследственном аппарате клеток хозяина [15].

Выводы

1. Метаболиты личинок токсокар обладают генотоксическим и цитотоксическим воздействиями на соматические и генеративные ткани хозяина, вызывая рост одноцепочечных разрывов, щелочно-лабильных сайтов ядерной молекулы ДНК, апоптотических клеток в костном мозге и семенниках. Генотоксическое воздействие наблюдается в периоды высокой биологической активности паразитов (первичной и повторной миграции паразитов в тканях хозяина), а цитотоксическое – на 14 день инвазии.

2. Генотоксическое влияние метаболитов личинок токсокар на соматические и генеративные клетки хозяина возрастает при увеличении дозы введенного инвазионного материала при заражении.

Литература

1. Бекиш Вл.Я. Изменение активности сперматогенеза у мышей линии СВА при экспериментальных гельминтозах // Фунд. науки и достижения клин. медицины и фармации (Тез. докл. 57 науч. сессии ВГМУ). – Витебск, 2002. – С. 5–6.
2. Бекиш Вл.Я., Бекиш О.-Я.Л. Состояние генома хозяина при гельминтозах. – Витебск, Изд. ВГМУ. – 2004. – 218 с.
3. Бекиш Вл.Я., Дурнев А.Д. Генотоксическое и цитотоксическое воздействия белковых соматических продуктов гельминтов на лимфоциты крови доноров *in vitro* // Бюллетень эксп. биол. и медицины. – 2004. – Т. 138, № 8. – С. 198–201.
4. Бекиш Вл.Я., Дурнев А.Д. Повреждения ДНК клеток костного мозга и семенников мышей при экспериментальном трихинеллезе // Бюллетень эксп. биол. и медицины. – 2004. – Т. 138, № 9. – С. 320–323.
5. Бекиш Вл.Я., Бекиш Л.Э., Колмогоров В.И. Экспериментальная модель висцерального токсокароза // Теоретич. и практические вопросы медицины и фармации (Матер. конф. студ. и молодых ученых). – Витебск, 2000. – С. 26–29.
6. Бекиш Вл.Я., Колмогоров В.И., Бекиш Л.Э. Влияние комбинированной терапии экспериментального токсокароза на состояние генома хозяина и свободнорадикальные процессы в семенниках // Вестник фармации. – 2003. – № 3. – С. 45–51.
7. Бекиш Вл.Я., Колмогоров В.И., Побяржин В.В. Микроядерный тест в клетках костного мозга и семенников мышей линии СВА при гельминтозах // Вестник ВГМУ. – Т. 2, № 2. – 2003. – С. 67–72.
8. Колмогоров В.И., Бекиш Вл.Я. Микроядерный тест в клетках семенников мышей линии СВА при экспериментальном токсокарозе // Эпидемиол., диагностика, лечение и профилактика паразит. заболеваний человека (Тр. III Международ. науч. - практич. конф.). – Витебск, 2002. – С. 77–81.
9. Колмогоров В.И., Бекиш Вл.Я. Повреждения генома хозяина при экспериментальном токсокарозе в зависимости от дозы введенного инвазионного материала при заражении // Совр. пробл. общей, мед. и ветерин. паразитологии (Тр. IV Международ. науч. - практич. конф.). – Витебск, 2004. – С. 75–80.
10. Boczon K., Wargin B. Inducible nitric oxide synthase in the muscles of *Trichinella* sp. - infected mice treated with glucocorticoid methyprednisolone // Compr. Parasitol. – 2000. – Vol. 67, № 2. – P. 230–235.
11. Espinoza E., Muro A., Martin M.-M.S., Casanueva P., Perez-Arellano J.L. *Toxocara canis* antigens stimulate the production of nitric oxide and prostaglandin E₂ by rat alveolar macrophages // Parasite Immunol. – 2002. – Vol. 24. – P. 311–319.
12. Hellman B., Vaghef H., Friis L., Edling C. Alkaline single cell gel electrophoresis of DNA fragments in biomonitoring for genotoxicity: an introductory study on healthy human volunteers // Int. Arch. Occup. Environ. Health. – 1997. – Vol. 69. – P.185–192.
13. Konca K., Lankoff A., Banasik A., Lisowska H., Kuszewski T., Gozdz S., Koza Z., Wojcik W. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay // Mutat. Res. (Gen. Toxicol. and Environ. Mutagenesis). – 2003. – Vol. 534. – P. 15–20.
14. Singh N., McCoy M., Tice R., Schneider E. A Simple Technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells // Exp. Cell Research. – 1988. – Vol. 175. – P.184–191.
15. Wang M.Q., Jiang H.J., Innoue H., Myozaki M., Yamashita U. B cell mitogenic activity of *Toxocara canis* adult worm antigen // Parasite Immunology. – 1995. – Vol. 17, № 12. – P. 609–615.

Поступила 10.12.2004 г.

Принята в печать 30.12.2004 г.